

【学位論文審査の要旨】

1 研究の目的

うつ病など精神疾患の増加は大きな社会問題となっており、その発症の分子メカニズムの解明が待望されているが、いまだ判っていない。精神疾患は神経活動の制御異常が関与していると考えられている。その神経活動は様々な因子によって制御されているが、制御因子の一つが脳で機能するプロテインキナーゼ Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)である。Cdk5 は、哺乳動物脳に発現する多機能性プロテインキナーゼで神経細胞の移動やシナプス活動、神経細胞死などの様々な神経活動に関わるユニークな因子である。最近、ADHD や統合失調症、双極性障害などの精神疾患にも関与が示唆されている。また、神経細胞の興奮のしやすさを決めている分子と考えられ、その活性は精神活動を制御することが示唆されている。これらのことから、Cdk5 が精神活動に関わる可能性が考えられるが、Cdk5 と精神疾患との関与を示す報告は少ない。本研究では、Cdk5 及び Cdk5 関連因子のいくつかに注目して、Cdk5 が精神活動にどのように関わるかを生化学及び行動解析実験にて調べることを目的とした。

2 研究の方法と結果

(1) Cdk5 は 5-HT_{1A}R をリン酸化し、発現量を調節する

脳の発生に関与し、精神疾患の創薬ターゲットでもあるセロトニン 1 A 受容体 (5-HT_{1A}R) が Cdk5 によってリン酸化されるのか生化学的な手法を用いて調べた。Phos-tag 方によりリン酸化を調べたところ、Cdk5 は実際に 5-HT_{1A}R をリン酸化していた。Cdk5 のリン酸化候補配列を非リン酸化型にした変異体 5-HT_{1A}R を作成して、T314 がリン酸化部位であることを同定した。野生型 5-HT_{1A}R は Cdk5 との共発現でタンパク質量が減少するのに対して、T314 の非リン酸化型 5-HT_{1A}R (T314A) は減少しなかった。5-HT_{1A}R の減少は、プロテアソームによる分解であった。5-HT_{1A}R の膜タンパク質である。その細胞内局在に対するリン酸化の影響を調べた。5-HT_{1A}R は形質膜および細胞質内の膜構造に存在していた。Cdk5 活性は細胞膜結合型 5-HT_{1A}R を優先的に分解しているようで、Cdk5 存在下では核近傍に局在が見られた。Cdk5 活性によって減少した 5-HT_{1A}R がセロトニンシグナルに及ぼす影響を調べた。5-HT_{1A}R は cAMP を合成するグアニルシクラーゼ活性を阻害している。細胞内 cAMP 量を測定したところ、5-HT_{1A}R の発現は cAMP 産生量を減少させていた。そこへ Cdk5 を発現させると、cAMP 産生量の減少が抑制され、実際に CDK5 は 5-HT_{1A}R の量の制御を介して、セロトニンシグナルを負に制御していることが示された。

(2) VPA は p 35 量を減少させることによって Cdk5 活性を下方制御する

バルプロ酸（VPA）はてんかんや双極性障害など広範囲な精神的疾病を含んだ気分障害への薬として使用されている。VPA を妊娠期に服用すると、子供が成長後に自閉症になる可能性が高いことが知られている。Cdk5 は脳の発生期に神経細胞の移動を制御している。VPA が Cdk5 活性に及ぼす影響を初代培養神経細胞で調べた。VPA 濃度及び時間依存的に Cdk5 活性化サブユニット p35 量は減少し、その時に Cdk5 活性も減少していた。Cdk5 のもう 1 つの活性化サブユニットである p39 量に影響はなかった。VPA は多くの遺伝子転写を調節する。p35 の減少も転写レベルでの影響であることを確認するため、p35mRNA を qPCR で測定した。p39 及び Cdk5 の mRNA は減少していなかったのに対して、p35 の mRNA は減少していた。VPA は HDAC 阻害剤である。p35 の減少は、HDAC 阻害を介してであるのか調べるため、VPA の誘導体で HDAC 阻害効果を持たない VPM 及び他の HDAC 阻害剤 TSA を用いて p35 量の減少を調べた。TSA で VPA と同様に p35 量が減少したのに対して、VPM では阻害が見られなかった。このことから、VPA は HDAC 阻害を介して p35mRNA を減少させることが判明した。

(3) VPA 慢性投与はマウス脳内の p35 量を減少させ、不安・うつ様行動を引き起こした

VPA は精神疾患患者に長期的に投与されることがある。VPA 慢性投与の p35 量への影響をマウスを用いて調べた。単回投与では p35 両に影響は見られなかったが、2 週間投与し続けたところ、マウス脳内の p35 量は減少した。VPA によって Cdk5 活性が下方制御される影響を、マウスの行動解析をよって調べた。VPA 慢性投与を行なったマウスでは不安・うつ様行動が惹起されていた。しかし、VPA は様々な生理活性を示すため、必ずしも p35 の減少を介してであるとは結論づけられない。特に VPA 慢性投与によっても影響を受けない p39 が脳内には残っているからである。VPA による Cdk5 活性低下と精神状態の相関をはっきりさせるため、p39 を欠損させた p39 KO マウスを用いて同様の解析を行った。しかし、予想に反して、VPA を投与した p39KO マウスでは、不安・うつ様行動は軽減されていた。その理由は現在不明である。

(4) Cdk5 の基質である LMTK1 を KO したマウスの行動解析

Cdk5 の基質の一つである Lemur kinase 1(LMTK1)は、哺乳動物脳で高発現する未解析の新規キナーゼである。当研究室の解析により、神経突起伸長を制御することがわかっている。神経突起の形成や伸長の異常は、回路形成を介して、精神活動にも影響する可能性が高い。そこで、LMTK1 の KO マウスを用いて、精神疾患関連の行動実験解析を行なった。まず、小脳におけるシナプス数に及ぼす影響を調べたところ、LMTK1 KO マウスでシナプス数、及びシナプス面積の増加が見られた。小脳のプレシナプスに変化が見られたことから、まず運動能力の解析を行った。KO マウスで運動協調性が亢進していた。社会性行動の解析を行なったところ、KO マウスで多動及び攻撃性が亢進していた。精神行動解析では、KO マウスの不安・うつ様行動が軽減されていた。

精神活動に影響を及ぼす薬で Cdk5 活性は影響を受け、また、Cdk5 はセロトニンなどの神経伝達物質の量の調節、また、神経回路形成に及ぼす因子 LMTK1 などを介して、精

神活動の調節にも関与していることが明らかとなった。

3 審査の結果

本研究では、Cdk5 及び Cdk5 関連因子のいくつかに注目して、Cdk5 が精神活動にどのように関わるかを調べた。第 1 章では、精神疾患創薬ターゲットである 5-HT_{1A}R が Cdk5 の新たな基質であること、またそのリン酸化部位も明らかにした。さらに、Cdk5 がリン酸化を介して 5-HT_{1A}R 量を調節することでセロトニンシグナルを制御することが明らかとなった。第 2 章では、気分障害の治療薬として用いられている VPA は HDAC 阻害効果によって p35 量を減少させ、それに伴い Cdk5 活性が低下することを見つけた。VPA の慢性投与で脳内の p35 量は恒常的に減少し、その結果不安・うつ様行動が増加する可能性が示された。第 3 章では、VPA と Cdk5 の関連を、p39KO マウスを用いて明確にした。不安・うつ様行動が軽減されていた。しかし、Cdk5 活性が不安・うつ様行動に関与する可能性も明らかにされた。第 4 章では、Cdk5 の基質の一つ LMTK1 の KO マウスを用いて、小脳でのシナプスが増加していること、LMTK1KO マウスは高い多動性と攻撃性を示すこと、運動協調性も亢進しており、うつ・不安用行動が減少していることを見つけた。。以上の結果から、Cdk5 活性は不安・うつ様行動、多動、攻撃性、運動協調などの精神活動に関与することが示された。これらの研究成果の一部はすでに国際雑誌にも発表され、国際的にも高く評価されており、本論文は博士（理学）の学位に十分値するものと判定した。

4 最終試験の結果

本学の学位規定にしたがって、試験および試問を行った。公開の席上で論文内容の発表を行い、生物科学専攻教員による質疑応答をもって試験とした。また、論文審査委員による本論文および関連分野の試問を行った。その結果、専門科目および外国語について十分な学力があることを認め合格と判定した。